

P20637

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : K. TSUGANEZAWA

Serial No. : Not Yet Assigned

PCT Branch

Filed : Concurrently Herewith

PCT/JP99/04479

For : EPIMORPHIN OF THE ORDER ARTIODACTYLA

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner of Patents and Trademarks

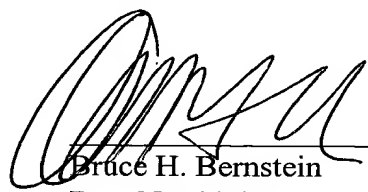
Washington, D.C. 20231

Sir:

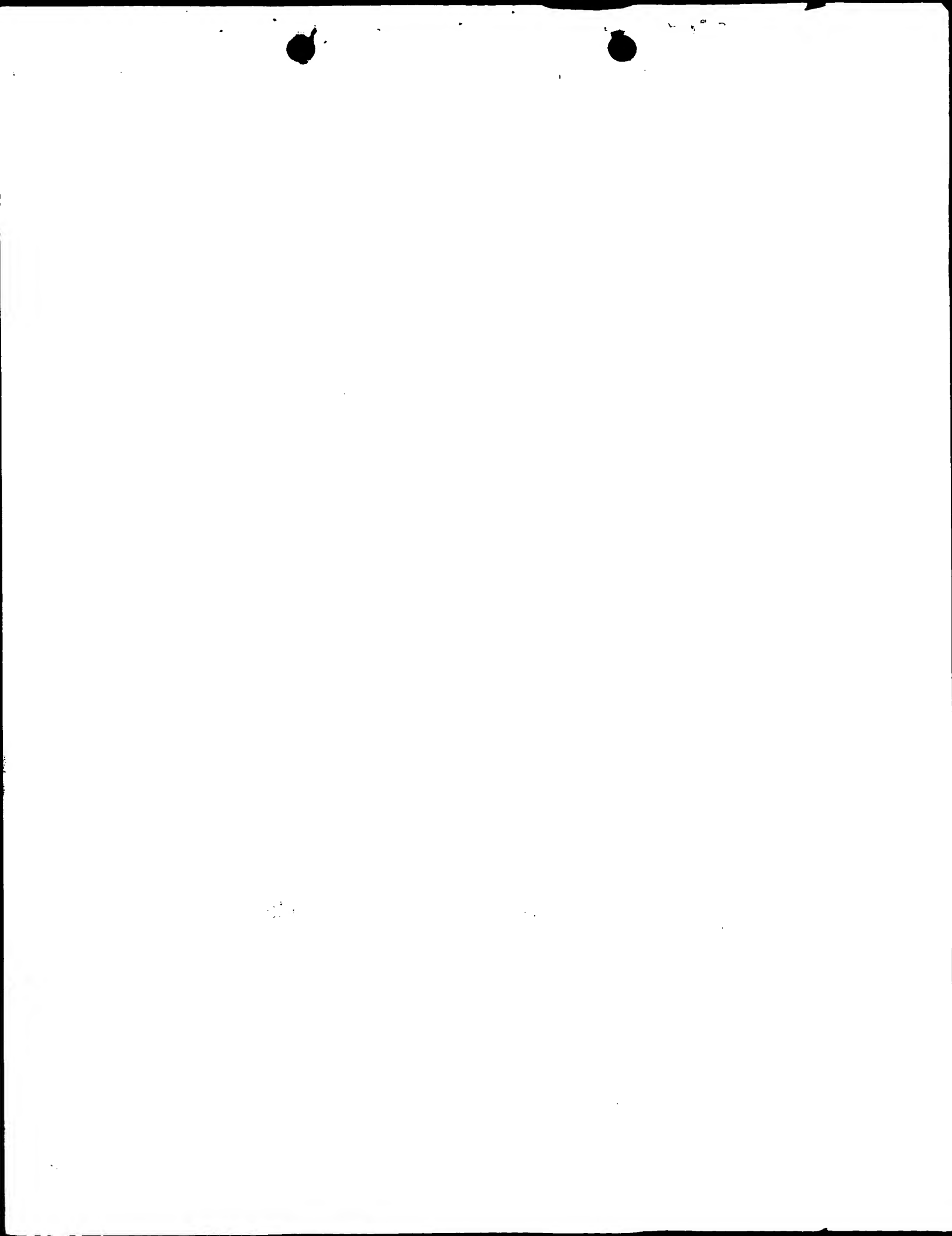
Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No.233892/1998 filed August 20, 1998. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
K. TSUGANEZAWA

February 16, 2001
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191


Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027

33,094



20.08.99

EU

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/744989

JP99/4479

REC'D 08 OCT 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 8月20日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第233892号

出 願 人

Applicant (s):

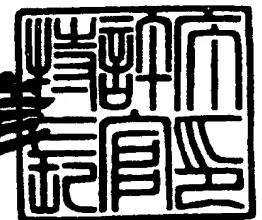
住友電気工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 9月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3064042

【書類名】 特許願

【整理番号】 98139M

【提出日】 平成10年 8月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/47
C12N 15/12

【発明の名称】 偶蹄目エピモルフィン

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市栄区田谷町 1 番地 住友電気工業株式会
社横浜製作所内

【氏名】 津金沢 恵子

【特許出願人】

【識別番号】 000002130

【氏名又は名称】 住友電気工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9808720

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 偶蹄目エピモルフィン

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 にいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項 2】 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列と 95% 以上のホモロジーを有する蛋白質。

【請求項 3】 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列を有する請求項 2 に記載の蛋白質。

【請求項 4】 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列を有する請求項 2 に記載の蛋白質。

【請求項 5】 配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質。

【請求項 6】 配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ毛の伸長を促進する蛋白質。

【請求項 7】 請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 8】 配列番号 2、配列番号 4、又は配列番号 6 のいずれかに記載の DNA である請求項 7 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】 請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質を認識する抗体

。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ブタ、ウシ、ヒツジなどの偶蹄目由来のエピモルフィンに関する。

【0002】

【従来の技術】

動物の諸器官は上皮組織がその形態を構築し、その周りに間充織細胞が存在しているが、エピモルフィン、間充織細胞の特に上皮細胞の近傍に多く発現している細胞膜蛋白である (Hirai, Y., et al., Cell, 69, pp.471-481, 1992)。上皮組織の形態形成の進行には、間充織細胞からのシグナルが必要であると言われている (Gumbiner, B.M., Cell., 69, pp.385-387, 1992)。エピモルフィンは、マウスの他にヒト、トリ及びラットでクローニングされており、疎水性部位の配列が異なるアイソフォームが存在することが知られている (Zha, H., et al., Genomics, 37, pp.386-389, 1996; Hirai, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 191, pp.1332-1337, 1993; Oka, Y., 発生生物学会, 1997年5月)。

【0003】

エピモルフィンは、マウスにおいては胎児上顎皮膚での毛の分化、胎児肺の管腔構造への分化という上皮組織の形態形成作用に深く関わっていることが知られている (Hirai, Y., et al., Cell, 69, pp.471-481, 1992; Koshida, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 234, pp.522-525, 1997)。また、間充織細胞を活性化し、IL-6、IL-8のサイトカイン分泌を促進している (Oka, Y., et al., Exp. Cell Res., 222, pp.189-198, 1996)。最近では、ミルクロテインを生産するSCp2細胞にエピモルフィンを加えると該細胞が増殖して分岐した管構造を形成することが明らかになっている (Hirai, Y., et al., J. Cell Biol., 140, pp.159-169, 1998)。エピモルフィンは、臓器の異常に起因する疾患の発症機序の解明、診断法、治療法の開発、毛や管腔・骨・歯の形成、血管の新生あるいは新たな創傷治療法の開発に有効であることが期待されている (Zha, H., et al., Genomics, 37, pp.386-389, 1996; Panaretto, B.A., Reprod. Fertil. Dev., 5, pp.345-360, 1993; Matsuki, Y., et al., Archs. Oral Biol., 40, pp.161-164, 1995)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

動物の乳中に所望の蛋白質を分泌させる、いわゆる動物工場が最近実用化されている。乳中に所望の蛋白質を分泌させるための動物としては、ウシ、ヒツジ等の

哺乳類偶蹄目の動物がよく利用されている。しかしながら、特に所望の蛋白質が比較的大きい場合又は所望の蛋白質の分泌量が多くなった場合は、乳腺が詰まって所望する蛋白質を体外に取り出せなくなる場合が多い。従って、効率のよい動物工場を実用化するためには、動物の乳腺を太くし、乳中に所望の蛋白質が多量に産生されても動物の乳腺が詰まらないようにする手段の開発が必要である。

【0005】

本発明者はエピモルフィンがSCD2細胞の分岐した管構造への分化を誘導することに着目し、偶蹄目エピモルフィン遺伝子を単離すべく鋭意研究を行った。その結果、偶蹄目動物のエピモルフィン遺伝子を単離することに成功し、その遺伝子産物が該動物の乳腺を太くする作用、すなわち管の内径を大きくするように乳腺細胞を分化させる作用を有することを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

【0006】

すなわち本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質（本明細書において、「ウシエピモルフィン2」という場合がある。）；配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質（本明細書において「ウシエピモルフィン4」という場合がある。）、及び、配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質（本明細書において「ヒツジエピモルフィン2」という場合がある。）を提供するものである。また、本発明により、配列表の配列番号1（ウシエピモルフィン2）に記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列と95%以上のホモロジーを有する蛋白質；配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列を有する蛋白質；及び配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列を有する蛋白質が提供される。

【0007】

さらに、配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ哺乳類動物由来のミルクプロテインを生産する細胞、好ましくは偶蹄目動物由来のミルクプロテインを生産する細胞において分岐した管腔構造

への分化を誘導する蛋白質；及び配列表の配列番号 1、3、又は 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ哺乳類動物、好ましくは偶蹄目動物の毛の伸長を促進する蛋白質が提供される。

【0008】

別の観点からは、本発明により、上記の各蛋白質をコードするポリヌクレオチドが提供される。この発明の好ましい態様によれば、配列番号 2、配列番号 4、及び配列番号 6 に記載の DNA が提供される。また、これらの配列表に記載の塩基配列のうちの連続する 12 以上の塩基からなる DNA が提供される。この DNA は二本鎖又は一本鎖のいずれでもよく、一本鎖の場合にはセンス鎖又はアンチセンス鎖のいずれであってもよい。また、上記の DNA にハイブリダイズする RNA；さらに上記ポリヌクレオチドを化学修飾したポリヌクレオチドも本発明により提供される。

【0009】

さらに、本発明により、上記ポリヌクレオチドを含む組換えベクター、該ベクターを含む微生物細胞又は哺乳類動物細胞などの形質転換細胞、及び該形質転換体を培養した培養物から上記蛋白質を分離・精製する工程を含む、上記蛋白質の製造方法が提供される。また、上記の各蛋白質を認識する抗体、好ましくはモノクローナル抗体が本発明により提供される。

【0010】

【発明の実施の形態】

従来、エピモルフィンには、3つのアイソフォームがあることが知られている（Hirai, Y., et al., J. Cell Biol., 140, pp.159-169, 1998）。これらのアイソフォームは、C末端部分のアミノ酸の数および性質（疎水性又は親水性）によりアイソフォーム 1、2、3 に分類されている。上記分類に従えば、本発明の蛋白質の好適な例である配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるウシエピモルフィン 2、及び配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列からなるヒツジエピモルフィン 2 は、それぞれ上記のアイソフォーム 2 に相当するものであると分類される。配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるウシエピモルフィ

ン4は、上記の分類のいずれにも合致せず、従来知られていない新しいタイプのアイソフォームである。

【0011】

エピモルフィン²は、構造上、4つのドメインに分けることができる。本明細書においても本発明のエピモルフィンを構造上4つの部分に分け、それぞれをN末端側から順にドメイン1、ドメイン2、ドメイン3、ドメイン4と呼ぶ。上記のウシエピモルフィン²、ウシエピモルフィン⁴、及びヒツジエピモルフィン²におけるドメイン1～4は以下のとおりである（配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を単に「アミノ酸配列1」といい、他の配列についても同様である。）。

ウシエピモルフィン²

ドメイン1：アミノ酸配列1の1番目から107番目

ドメイン2：アミノ酸配列1の108番目から187番目

ドメイン3：アミノ酸配列1の188番目から262番目

ドメイン4：アミノ酸配列1の263番目から287番目

【0012】

ウシエピモルフィン⁴

ドメイン1：アミノ酸配列3の1番目から107番目

ドメイン2：アミノ酸配列3の108番目から187番目

ドメイン3：アミノ酸配列3の188番目から262番目

ドメイン4：アミノ酸配列3の263番目から269番目

ヒツジエピモルフィン²

ドメイン1：アミノ酸配列5の1番目から107番目

ドメイン2：アミノ酸配列5の108番目から187番目

ドメイン3：アミノ酸配列5の188番目から262番目

ドメイン4：アミノ酸配列5の263番目から287番目

【0013】

ドメイン1とドメイン3はコイルドコイル領域であり、それぞれ、N側コイルドコイル領域、C側コイルドコイル領域とよばれている。ドメイン4は疎水性領域であり、C末端疎水性領域と呼ばれる。ヒトおよびマウスエピモルフィンの知見

から、各ドメインは、以下の機能を有することが知られている。

ドメイン1：胎児上顎皮膚での毛の分化促進、胎児肺の管腔構造への分化促進、及び間充織細胞の活性化、並びにIL-6及びIL-8のサイトカイン分泌促進。

ドメイン2：細胞接着とGM-CSF（成長因子、サイトカインの一種）の分泌促進。

ドメイン3：機能未知

ドメイン4：タイプ1の細胞膜結合ドメイン

【0014】

ミルクプロテインを生産する細胞の管腔構造の分化促進は、ドメイン1またはドメイン2の機能である。エピモルフィン及びこれらのドメインの機能は、既報の方法で確認できる。なお、ウシエピモルフィン2、ウシエピモルフィン4、及びヒツジエピモルフィン2について説明した上記各ドメインに相当するポリペプチド、並びに上記各ドメインのアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、上記各ドメインと実質的に同様な生物作用を有するポリペプチドも本発明の範囲に包含される。

【0015】

前記の3つのエピモルフィンについて、ウシエピモルフィン2の1番目から262番目までのアミノ酸配列とウシエピモルフィン4の1番目から262番目までのアミノ酸配列は完全に一致しており、このアミノ酸配列とヒツジエピモルフィン2の1番目から262番目までのアミノ酸配列とは、ホモロジーが99.2%と非常によく保存されている。従って、この部分のアミノ酸配列は偶蹄目エピモルフィンを特徴付けるアミノ酸配列であり、このアミノ酸配列からなる蛋白質は本発明の好ましい態様である。また、ウシエピモルフィン2の1番目から262番目までのアミノ酸配列と95%以上、好ましくは98%以上のホモロジーを有し、上記アミノ酸配列と実質的に等価な機能を有する蛋白質は、いずれも本発明の範囲に包含される。なお、ヒツジエピモルフィン2とヒトエピモルフィンとの1番目から262番目までのアミノ酸配列におけるホモロジーは94.3%であり、この場合もよく保存されている。

【0016】

上記に説明した各蛋白質のほか、配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの一または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質、並びに、配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの一または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ毛の伸長を促進する蛋白質も本発明の範囲に包含される（本明細書において、これらの蛋白質を「改変蛋白質」と呼ぶ場合がある。また、単に「本発明の蛋白質」という場合には、特に言及しない限り、これらの改変蛋白質をも包含する概念として用いる。）。

ミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する作用については、J. Cell Biol., 140, pp.159-169, 1998に記載された方法により確認することが可能である。また、従来公知のエピモルフィン類には毛の伸長を促進する作用があることが知られている（Hirai, Y., et al., Cell, 69, pp.471-481, 1992）。

【0017】

このような改変蛋白質は、配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするDNAを有する大腸菌などをN-ニトロ-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンなどの薬剤を用いて突然変異処理し、菌体から改変蛋白質をコードする遺伝子を回収した後、通常の遺伝子発現操作を行うことによって製造できる。また、前記遺伝子を亜硫酸ナトリウムなどの薬剤で直接処理するか、あるいは部位特異的変異法（Kramer, W. et al., Methods in Enzymology, 154, 350, 1987）やリコンビナントPCR法（PCR Technology, Stockton press, 1989）などの手法によってヌクレオチドの欠失、置換、又は付加を直接導入してもよい。

【0018】

本発明の蛋白質をコードする遺伝子を取得する方法は特に限定されないが、例えば、本明細書の実施例に具体的に説明した方法により効率よく遺伝子DNAを取得することができる。遺伝暗号の縮重により、ポリヌクレオチドから生産された

ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく、該ポリヌクレオチドの塩基配列の少なくとも一部の塩基を他の種類の塩基に置換することができることは当業者に周知である。従って、本発明のポリヌクレオチドには、配列番号 1, 3、又は 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするエピモルフィン遺伝子はすべて包含される。本発明の好ましい遺伝子の例として、配列表の配列番号 2、配列番号 4、及び配列番号 6 には、それぞれウシエピモルフィン 2、ウシエピモルフィン 4、及びヒツジエピモルフィン 2 をコードする遺伝子 DNA の具体例を示した。

【0019】

本発明の範囲には、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチドおよびその誘導体が包含される。アンチセンスポリヌクレオチドは上記ポリヌクレオチドの一態様として提供されるが、本明細書において、特にアンチセンス鎖の塩基配列からなるポリヌクレオチドであることを明示する場合に「アンチセンスポリヌクレオチド」という場合がある。該アンチセンスポリヌクレオチドは、上記の各蛋白質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能であり、それがハイブリダイズするポリヌクレオチドがコード領域のポリヌクレオチドであれば、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの生合成を阻害することが可能である。

【0020】

ポリペプチドの生合成を阻害するためのアンチセンスポリヌクレオチドは、12 塩基以上からなることが好ましい。一方、細胞内に全長のアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませるためには、必要以上に長い配列は好ましくない。細胞内にアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませ、上記蛋白質の生合成を阻害する場合には、12 塩基以上 30 塩基以下、好ましくは 15 塩基以上 25 塩基以下、より好ましくは 18 塩基以上 22 塩基以下の塩基からなるアンチセンスポリヌクレオチドを用いるのがよい。

【0021】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体には、天然に存在するか否かにかかわらず、塩基、リン酸、及び糖からなるヌクレオチドが複数結合し

たものが全て包含される。代表的なものは、天然型のアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAである。非天然型のポリヌクレオチドとしては、例えば、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型などのポリヌクレオチドを挙げることができる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドについて、当業者に利用可能なアンチセンス技術を用いて、目的のDNAやmRNAとの結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性などに優れた様々なアンチセンスポリヌクレオチド誘導体を得られる。

【0022】

一般的には、ハイブリダイズのし易さの点では、ステムループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列を持つアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体を設計することが好ましい。従って、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドおよびその誘導体は、必要に応じてステムループを形成することが可能であり、そのような態様は本発明のアンチセンスポリヌクレオチドの好ましい例である。また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、又はスプライス部位の配列に相補的な配列を有するようなアンチセンスポリヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できる。したがって、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体であって、上記の各蛋白質をコードする遺伝子またはmRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、及び／又はスプライス部位の相補的な配列を含むものは、発現抑制効果の観点から好ましい態様である。

【0023】

現在、一般的に知られているポリヌクレオチド誘導体のうち、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも一が高められた誘導体として、好ましくはフォスフォロチオエート結合を骨格構造として有する誘導体を挙げることができる。本発明のポリヌクレオチドおよびその誘導体には、これらの機能または構造を有する誘導体が含まれる。

【0024】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドのうち、天然型のアンチセンスポリヌクレオチドについては、化学合成機を使用して合成するか、上記の各蛋白質をコー

ドするDNAを鋳型とするPCR法により製造することができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型などのポリヌクレオチド誘導体は、通常、化学合成により製造することができる。この場合には、化学合成機に添付されている説明書に従って操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することが可能である。

【0025】

本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチド、そのアンチセンスポリヌクレオチドまたはそれらの一部（連続する12塩基以上の塩基配列からなるポリヌクレオチド）であるポリヌクレオチドは、cDNAライブラリー等から本発明の遺伝子をスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。このような目的には、GC含有率が30ないし70%のものが好適に使用可能である。また、連続する15塩基以上の塩基配列からなるポリヌクレオチドが特に好ましい。プローブとして用いる該ポリヌクレオチドは誘導体であってもよい。通常、前記の塩基数以上の配列は特異性のある配列であると認識されている。

【0026】

該プローブを用いたスクリーニングにおいて使用するcDNAライブラリーとしては、mRNAから作製されたものが好ましく使用できる。これらのcDNAライブラリーからランダムサンプリングにより選択された一群のcDNAを検索の試料とすることができる。また、市販のものも使用可能である。例えば、配列表の配列番号2、4、又は6に記載の塩基配列のうちの連続する12塩基以上の塩基配列からなるDNAまたは該DNAにハイブリダイズするポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチド）は、それぞれ配列番号1、3、又は5に記載のアミノ酸配列をコードするDNAをcDNAライブラリー等からスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。

【0027】

また、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくはそのアンチセンスポリヌクレオチド、またはそれらの一部であるポリヌクレオチドをプローブとして、各組織由来のmRNAについてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うことにより、本発明の遺伝子由来のmRNAが発現している組織を見出すこ

とが可能である。

【0028】

本発明の遺伝子とハイブリダイズするcDNAを適当なベクターに挿入した後、宿主（例えば大腸菌）に導入することで形質転換体を作製することができる。ベクターの種類及び宿主の種類は特に限定されないが、宿主の種類に応じて適宜の発現用ベクターを選択して用いることが可能である。宿主としては、大腸菌等の細菌類、酵母、又は動物細胞のいずれも使用可能であるが、動物細胞を用いることが好ましく、哺乳類動物細胞を用いることが特に好ましい。組換えベクターを大腸菌等の適当な宿主に導入して形質転換体を得る方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。

【0029】

本発明の遺伝子を導入した形質転換体を培養して遺伝子DNAの増幅または蛋白質の発現を行わせ、本発明の蛋白質を製造することが可能である。形質転換体の製造及び培養については各種の成書及び報告があり、種々の手段が開発され、当業界で汎用されている。従って、当業者は本明細書に記載された塩基配列に基づいて本発明の蛋白質を容易に製造することが可能である。細胞に遺伝子を導入する手法として、塩化カルシウム法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法などを用いることができる。特に、核内微量注入法を用いることが好ましい。

【0030】

培養物から目的蛋白質の分離及び精製は当業者に利用可能な手段を適宜組み合わせで行うことができる。例えば、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種クロマトグラフィー等の操作を行うことにより、本発明の蛋白質を効率よく回収及び精製することが可能である。より具体的には、免疫沈降法、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法や抗体クロマトグラフィー法等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー法、及び逆相クロマトグラフィー法などを適宜選択して行えばよい。

【0031】

また、本発明の蛋白質は、他のポリペプチドとの融合ペプチドとして製造することも可能である。このような融合ペプチドも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。融合すべきポリペプチドの種類は特に限定されないが、例えば、細胞外分泌を促進するシグナルペプチドなどを挙げることができる。このような融合蛋白質の製造も形質転換体を用いて行うことができる。融合蛋白質を用いて本発明の蛋白質又は改変蛋白質を製造する場合には、融合蛋白質をブロムシアン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理し、切り出された目的物を分離及び精製すればよい。

【0032】

また、本発明の蛋白質又は改変蛋白質においてエピモルフィン様の生物活性を担う部分ポリペプチド（いわゆる活性ドメイン）と他のポリペプチドとの融合蛋白質を製造することも可能である。このような活性ドメインとしては、例えば、上記のドメイン1及び／又はドメイン2を用いることができる。例えば、ドメイン4を除去することにより活性ドメインを含む可溶性ポリペプチドを製造することができ、このように可溶化された活性ドメインと他のポリペプチド（例えばシグナルペプチド）との融合蛋白質を製造することができる。なお、本発明の蛋白質の上記各ドメイン及び他の種のエピモルフィンの各ドメインから選ばれる複数のドメインを適宜組み合わせるキメラ型のエピモルフィンを製造してもよい。また上記の各ドメインを適宜組み合わせたポリペプチドに対して、さらに他のポリペプチドを結合して融合蛋白質を製造してもよい。

【0033】

本発明の蛋白質又はそれらの部分ポリペプチド鎖を用いて、本発明の蛋白質を認識する抗体を製造することができる。本発明の抗体は、哺乳類動物を本発明の蛋白質で免疫感作することによって当業界で汎用の方法に従って製造できる。該抗体が本発明の蛋白質を認識することは、ウェスタンブロット法、ELISA法、又は免疫染色法（例えばFACSでの測定）等により確認することが可能である。免疫原としては、本発明の蛋白質のほか、それらの一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものを用いてもよい。この場合、本発明の蛋白質の一部は8アミノ酸残基以上であることが好ましく、このようなポリ

ペプチドは、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。

【0034】

また、免疫した動物のリンパ球を用いて製造したハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を本発明の抗体として用いてもよい。モノクローナル抗体の製造方法については当業界で周知されており、かつ汎用されている（『Antibodies A Laboratory Manual』（Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988）Chapter 6）。また、本発明の抗体として、上記の抗体の活性フラグメントを用いることも可能である。本明細書において、活性フラグメントとは抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントを意味しており、具体的には、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv などを挙げることができる。例えば、本発明の抗体をペプシンで分解すると $F(ab')_2$ が得られ、パパインで分解すると Fab が得られる。 $F(ab')_2$ を2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化すると Fab' が得られる。 Fv は重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをリンカーで結合させた一価の抗体活性フラグメントである。これらの活性フラグメントを保持し、その他の部分を他の動物のフラグメントに置換することでキメラ抗体が得られる。上記に説明した抗体及び活性フラグメントなどは、いずれも本発明の範囲に包含される。

【0035】

本発明の蛋白質は、抗体を用いる方法又は酵素反応を利用する方法などに従って検出可能である。抗体を用いて本発明の蛋白質を検出する方法としては、具体的には、(I)標識された上記抗体を用いて本発明の蛋白質を検出する方法、(II)上記抗体および該抗体の標識二次抗体を用いて本発明の蛋白質を検出する方法が挙げられる。標識としては、例えば放射性同位元素（RI）、酵素、アビジン又はビオチン、もしくは蛍光物質（FITCやローダミン等）が利用される。酵素反応を利用する方法としては、例えば、ELISA法、免疫凝集法、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリーを用いた免疫反応分子の同定方法又はそれらに類似する方法が挙げられる。

【0036】

本発明の蛋白質は、エピモルフィン様の生物活性、例えば、ミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する作用、及び毛の伸長を促進する作用を発揮できる。本発明の蛋白質は、偶蹄目動物に対する医薬又は動物改質剤として用いることが可能である。例えば、ウシやヒツジなどの偶蹄目動物の乳腺を太くし、乳腺の詰まりを防いで該動物の乳中に分泌される所望の蛋白質の収量を増やすことができる。また、本発明の遺伝子を用いて、羊毛の生産性の高いヒツジや、目的蛋白質の生産性の高い遺伝子導入動物（動物工場）を産生することが可能である。

【0037】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

本発明のヒツジ及びウシエピモルフィン遺伝子を、以下に記載の方法により、取得した。

1. エピモルフィン cDNA の単離

1) プローブとするDNAをRandom Primed DNA Labeling Kit（ベーリンガー社製）を用いて取扱説明書の通りに標識した。プローブとするDNAは、マウスエピモルフィンのコード領域の全長の塩基配列からなるDNAを使用した。

【0038】

2) 次に、下記の組成のDNA反応液を調製し、この液を37℃で30分間インキュベートした後、65℃で10分間熱処理し、酵素を失活させた。

| | |
|---|----------|
| DNAプローブ (50 ng/μl) | 2 μl |
| H ₂ O | 7 μl |
| dNTPs | 3 μl |
| [α- ³² P] d-CTP (370 MBq/ml) (アマシャム社製) | 5 μl |
| Primer | 2 μl |
| Klenow enzyme | 1 μl |
| | 合計 20 μl |

【0039】

3) H_2O で膨潤させたCentri-Sepスピンカラム（プリンストンセパレーション社製）で遠心して、標識化DNAプローブを得た。

4) ライブラリーはヒツジ肺及びウシ肺を使い（Uni-ZAPXR Library, STRATAGENE社製）、常法（新細胞工学実験プロトコール（秀潤社））によりファージプラークを得た。

5) 3) で得られた標識化DNAプローブをシンチレーションカウンターで測定し、 1×10^6 cpm/mlになるようにハイブリダイゼーション反応液に加え、プラーク由来のcDNAを固定したナイロンメンブレン（アマシャム社製、Hybond-N+）と反応させた。

【0040】

プレハイブリダイゼーション

反応液 ExpressHyb（クローンテック社製）

反応温度 $68^\circ C$

反応時間 30分間

ハイブリダイゼーション

反応液 ExpressHyb（クローンテック社製）

^{32}P 標識cDNAプローブ 1×10^6 cpm/ml

反応温度 $68^\circ C$

反応時間 1時間

【0041】

6) ハイブリダイズの終了したメンブレンを以下の液でExpressHyb（クローンテック社製）のプロトコール通りに洗浄した。

$2 \times SSC$ 、 $0.05\% SDS$ 500ml

室温

時間 40分間

$0.1 \times SSC$ 、 $0.1\% SDS$

$50^\circ C$

時間 40分間

【0042】

7) 洗浄したナイロンメンブレンをX線フィルム（例えば、コダック社製XAR 5フィルム）に -80°C で一晩露光し、オートラジオグラフを撮影した。

8) 得られたオートラジオグラフから、陽性のプラークの位置を決定し、対応する寒天上のプラーク中のファージをSM溶液に回収した。

9) 回収したファージは、常法（新細胞工学実験プロトコル（秀潤社））により再度NZY寒天培地上にプラーク形成を行わせ、ナイロンメンブレン上に固定した。

10) 5)～9)の過程を3回繰り返し、陽性のプラーク中のファージを単一なものにした。該ファージを回収し、 $500\mu\text{l}$ のSM溶液に懸濁し、 $20\mu\text{l}$ のクロロホルムを加えて攪拌し、ファージ液を作製した。該ファージ液から単離したcDNAにヒツジ及びウシエピモルフィン遺伝子が含まれていた。

【0043】

2. ヒツジ及びウシエピモルフィンcDNAの大量調製

1) SM溶液に懸濁したファージ液 $10\mu\text{l}$ とXL1-Blue大腸菌（ストラタジーン社製） $200\mu\text{l}$ とヘルパーファージ（ストラタジーン社製） $1\mu\text{l}$ を混合し、 37°C 、15分間反応させた。

2) その後、 3ml LB培地に1)で混合した溶液を移し、 37°C で1晩振とうすることにより遺伝子をpBluescript phagemidとして切り出した。

3) 70°C で20分間処理した後、 1000rpm 、15分間遠心分離し、上清を回収した。

【0044】

4) 上清 $100\mu\text{l}$ とSOLR大腸菌 $200\mu\text{l}$ を混合し 37°C で15分間反応させた。

5) その後、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB培地のプレートに4)で反応した溶液 $10\mu\text{l}$ をまき、 37°C で一晩培養した。

6) 1コロニーを $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB培地 3ml に加え、 37°C で1晩振とう培養した。

7) 2000 rpm、10分間遠心分離し大腸菌を回収した。

8) Plasmid Mini Kit (QIAGEN社製) を使って精製し、ヒツジ又はウシエピモルフィン遺伝子を含んだプラスミドDNAを大量に調製した。

【0045】

3. ヒツジ及びウシエピモルフィン cDNA の塩基配列の決定

オートシーケンサーを用いたダイターミネーター法によりプラスミドDNA中のヒツジ及びウシエピモルフィン遺伝子の全塩基配列を決定した。

4. アミノ酸配列の決定

上記3. で決定した塩基配列から、ヒツジ及びウシエピモルフィンのアミノ酸配列を決定した。

それぞれのアミノ酸配列から、ヒツジエピモルフィン2、ウシエピモルフィン2、ウシエピモルフィン4 とそれぞれ名付けた。

5. 形質転換体の作製

ヒツジエピモルフィン2、ウシエピモルフィン2およびウシエピモルフィン4それぞれのcDNAをpBluescript SK (-) プラスミドに挿入し、大腸菌SOLR株に導入して形質転換体を作製した。これらを、それぞれSh-E PM2、Bo-E PM2、Bo-E PM4と名付けた。

【0046】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Sumitomo Electric Industries, Co., Ltd.

<120> Artiodactyla epimorphin

<130> 98139M

<160> 6

<210> 1

<211> 287

<212> PRT

<213> Bos

<400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Asp | Arg | Leu | Pro | Asp | Leu | Thr | Ala | Cys | Arg | Lys | Asn | Asp | Asp |
| | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gly | Asp | Thr | Thr | Val | Val | Val | Glu | Lys | Asp | His | Phe | Met | Asp | Asp | Phe |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| Phe | His | Gln | Val | Glu | Glu | Ile | Arg | Asn | Ser | Ile | Ala | Lys | Ile | Ala | Gln |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | |
| Tyr | Val | Glu | Glu | Val | Lys | Lys | Asn | His | Ser | Ile | Ile | Leu | Ser | Ala | Pro |
| | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | |
| Asn | Pro | Glu | Gly | Lys | Ile | Lys | Glu | Glu | Leu | Glu | Asp | Leu | Asn | Lys | Glu |
| | | | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | |
| Ile | Lys | Lys | Thr | Ala | Asn | Lys | Ile | Arg | Thr | Lys | Leu | Lys | Ser | Ile | Glu |
| | | | | | 85 | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Gln | Ser | Phe | Asp | Gln | Asp | Glu | Gly | Gly | Asn | Arg | Thr | Ser | Val | Glu | Leu |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| Arg | Ile | Arg | Arg | Thr | Gln | His | Ser | Val | Leu | Ser | Arg | Lys | Phe | Val | Glu |
| | | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | |
| Val | Met | Thr | Glu | Tyr | Asn | Glu | Ala | Gln | Thr | Leu | Phe | Arg | Glu | Arg | Ser |
| | | | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | |
| Lys | Gly | Arg | Ile | Gln | Arg | Gln | Leu | Glu | Ile | Thr | Gly | Lys | Thr | Thr | Thr |
| | | | | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | |
| Asp | Asp | Glu | Leu | Glu | Glu | Met | Leu | Glu | Ser | Gly | Asn | Pro | Ser | Ile | Phe |
| | | | | | 165 | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Thr | Ser | Asp | Ile | Ile | Ser | Asp | Ser | Gln | Ile | Thr | Arg | Gln | Ala | Leu | Asn |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | |
| Glu | Ile | Glu | Ser | Arg | His | Lys | Asp | Ile | Met | Lys | Leu | Glu | Thr | Ser | Ile |
| | | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | |
| Arg | Glu | Leu | His | Glu | Met | Phe | Met | Asp | Met | Ala | Met | Phe | Val | Glu | Thr |
| | | | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | |

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Lys Asn Val Met Asn Ala Ala
 225 230 235 240
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
 245 250 255
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Met Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Val
 260 265 270
 Ile Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser
 275 280 285

<210> 2

<211> 864

<212> DNA

<213> Bos

<400> 2

| | |
|---|-----|
| ATG CGG GAC CGG CTG CCG GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAA AAT GAT GAT | 48 |
| GGG GAC ACA ACT GTT GTT GTT GAA AAG GAC CAT TTT ATG GAT GAT TTC | 96 |
| TTC CAT CAG GTC GAG GAG ATC AGA AAC AGT ATA GCG AAA ATA GCT CAG | 144 |
| TAT GTC GAA GAA GTG AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA | 192 |
| AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAG GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA | 240 |
| ATC AAG AAA ACT GCT AAT AAA ATA AGG ACT AAG TTG AAG TCT ATT GAA | 288 |
| CAG AGT TTT GAT CAG GAT GAG GGT GGA AAC CGA ACT TCT GTG GAG CTT | 336 |
| CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCA GTG CTA TCT CGA AAG TTT GTG GAA | 384 |
| GTC ATG ACA GAA TAT AAC GAA GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGA AGC | 432 |
| AAA GGC CGT ATA CAG CGT CAG CTA GAA ATA ACT GGA AAA ACT ACC ACC | 480 |
| GAT GAT GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAA AGT GGG AAT CCC TCC ATC TTC | 528 |
| ACG TCA GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAG GCT CTC AAT | 576 |
| GAA ATT GAG TCC CGT CAT AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACA AGC ATC | 624 |
| CGT GAG CTA CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCC ATG TTC GTC GAG ACT | 672 |
| CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AAA AAT GTT ATG AAT GCC GCA | 720 |
| GAC TAT GTA GAA CAT GCA AAA GAA GAA ACG AAG AAA GCT ATT AAA TAT | 768 |

CAA AGC AAA GCA AGA AGG AAA ATG ATG TTC ATT ATT ATT TGT GTA GTT 816

ATT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG 864

<210> 3

<211> 274

<212> PRT

<213> Bos

<400> 3

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp

5 10 15

Gly Asp Thr Thr Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe

20 25 30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Ala Lys Ile Ala Gln

35 40 45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro

50 55 60

Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu

65 70 75 80

Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Thr Lys Leu Lys Ser Ile Glu

85 90 100

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Gly Gly Asn Arg Thr Ser Val Glu Leu

105 110 115

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu

120 125 130

Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser

135 140 145

Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Lys Thr Thr Thr

150 155 160 165

Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ile Phe

| | | |
|---|-----|-----|
| 170 | 175 | 180 |
| Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn | | |
| 185 | 190 | 195 |
| Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile | | |
| 200 | 205 | 210 |
| Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr | | |
| 215 | 220 | 225 |
| Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Lys Asn Val Met Asn Ala Ala | | |
| 230 | 235 | 240 |
| Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr | | |
| 250 | 255 | 260 |
| Gln Ser Lys Ala Arg Arg Val Ser Leu Val Phe Gln Ser | | |
| 265 | 270 | |

<210> 4
 <211> 810
 <212> DNA
 <213> Bos
 <400> 4

| | |
|---|-----|
| ATG CGG GAC CGG CTG CCG GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAA AAT GAT GAT | 48 |
| GGG GAC ACA ACT GTT GTT GTT GAA AAG GAC CAT TTT ATG GAT GAT TTC | 96 |
| TTC CAT CAG GTC GAG GAG ATC AGA AAC AGT ATA GCG AAA ATA GCT CAG | 144 |
| TAT GTC GAA GAA GTG AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA | 192 |
| AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAG GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA | 240 |
| ATC AAG AAA ACT GCT AAT AAA ATA AGG ACT AAG TTG AAG TCT ATT GAA | 288 |
| CAG AGT TTT GAT CAG GAT GAG GGT GGA AAC CGA ACT TCT GTG GAG CTT | 336 |
| CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCA GTG CTA TCT CGA AAG TTT GTG GAA | 384 |
| GTC ATG ACA GAA TAT AAC GAA GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGA AGC | 432 |
| AAA GGC CGT ATA CAG CGT CAG CTA GAA ATA ACT GGA AAA ACT ACC ACC | 480 |
| GAT GAT GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAA AGT GGG AAT CCC TCC ATC TTC | 528 |

| | |
|---|-----|
| ACG TCA GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAG GCT CTC AAT | 576 |
| GAA ATT GAG TCC CGT CAT AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACA AGC ATC | 624 |
| CGT GAG CTA CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCC ATG TTC GTC GAG ACT | 672 |
| CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AAA AAT GTT ATG AAT GCC GCA | 720 |
| GAC TAT GTA GAA CAT GCA AAA GAA GAA ACG AAG AAA GCT ATT AAA TAT | 768 |
| CAA AGC AAA GCA AGA AGG GTG AGT TTG GTC TTT CAG AGT TGA | 810 |

<210> 5

<211> 287

<212> PRT

<213> Ovis

<400> 5

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp

1 5 10 15

Gly Asp Thr Thr Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe

20 25 30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Ala Lys Ile Ala Gln

35 40 45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro

50 55 60

Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu

65 70 75 80

Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Thr Lys Leu Lys Ser Ile Glu

85 90 95

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Gly Gly Asn Arg Thr Ser Val Glu Leu

100 105 110

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu

115 120 125

Val Met Thr Glu Phe Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser

| | | |
|---|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 |
| Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Lys Thr Thr Thr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ile Phe | | 160 |
| 165 | 170 | 175 |
| Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Lys Asn Val Thr Asn Ala Ala | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr | | 240 |
| 245 | 250 | 255 |
| Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Met Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Val | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Ile Leu Leu Val Ile Phe Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser | | |
| 275 | 280 | 285 |

<210> 6

<211> 864

<212> DNA

<213> Ovis

<400> 6

| | |
|---|-----|
| ATG CGG GAC CGG CTG CCG GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAA AAT GAT GAT | 48 |
| GGG GAC ACA ACT GTT GTT GTT GAA AAG GAC CAT TTT ATG GAT GAT TTC | 96 |
| TTC CAT CAG GTC GAG GAG ATC AGA AAC AGT ATA GCA AAA ATA GCT CAG | 144 |
| TAT GTC GAA GAA GTG AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA | 192 |
| AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAG GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA | 240 |

| | |
|---|-----|
| ATC AAG AAA ACT GCC AAT AAA ATT CGG ACT AAG TTG AAG TCT ATT GAA | 288 |
| CAG AGT TTT GAT CAG GAT GAG GGT GGA AAC CGA ACT TCT GTG GAG CTT | 336 |
| CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCA GTG CTA TCT CGA AAG TTT GTG GAA | 384 |
| GTC ATG ACA GAA TTT AAT GAA GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGA AGC | 432 |
| AAA GGC CGT ATA CAG CGT CAG CTA GAA ATA ACT GGA AAA ACT ACC ACC | 480 |
| GAT GAT GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAA AGT GGG AAT CCC TCC ATC TTC | 528 |
| ACG TCA GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGA CAG GCT CTG AAT | 576 |
| GAA ATT GAG TCC CGT CAT AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACG AGC ATC | 624 |
| CGT GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCC ATG TTC GTC GAG ACC | 672 |
| CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AAA AAT GTT ACG AAT GCC GCA | 720 |
| GAC TAT GTT GAG CAT GCT AAA GAA GAA ACG AAG AAA GCC ATT AAA TAT | 768 |
| CAA AGC AAA GCA AGA AGG AAA ATG ATG TTC ATT ATT ATC TGT GTA GTT | 816 |
| ATT TTG CTT GTG ATC TTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG | 864 |

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 ウシやヒツジなどの偶蹄目動物においてミルクプロテインを生産する細胞に対して分岐した管腔構造への分化を誘導する作用を有する配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質エピモルフィン及び該蛋白質をコードする遺伝子。

【効果】 偶蹄目動物に対する医薬又は動物改質剤として用いることができ、例えば、ウシやヒツジなどの乳腺を太くし、乳腺の詰まりを防いで動物の乳中に分泌される所望の蛋白質の収量を増やすことができる。

職権訂正履歴（書類修正）

| | |
|---------|--------------------|
| 特許出願の番号 | 平成10年 特許願 第233892号 |
| 受付番号 | 59800507106 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 林本 光世 2305 |
| 作成日 | 平成11年 3月24日 |

<修正内容>

【発明の詳細な説明】の前に「。」が記載されているため論理構造が付与されない。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

{000002130}

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

氏 名

住友電気工業株式会社